

3  
4  
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6  
7 I PODACI O KOMISIJI:

8  
9 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju: Nastavno-naučno veće Fakulteta  
10 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu na 214-toj sednici, održanoj 24.03.2021.  
11 godine.

12  
13 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže  
14 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,  
15 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

- 16  
17 1. Dr Mirjana Dimitrijević, redovni profesor, Higijena i tehnologija mesa, 2019. godina,  
18 Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu- Mentor 1  
19 2. Dr Branko Velebit, naučni savetnik, Bezbednost hrane, 2020. godina, Institut za  
20 higijenu i tehnologiju mesa, Beograd – Mentor 2  
21 3. Dr Neđeljko Karabasil, redovni profesor, Higijena i tehnologija mesa, 2018. godina,  
22 Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu  
23 4. Dr Sonja Radojičić, redovni profesor, Epizootiologija, Zarazne bolesti životinja i  
24 bolesti pčela, 2011. godina, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu  
25 5. Dr Andrej Kirbiš, redovni profesor, Higijena i kontrola hrane životinjskog porekla,  
26 2018. godina, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Ljubljani  
27

28 **Napomena:** redosled članova Komsije je takav da se prvo navode nastavnici sa FVM a zatim članovi iz drugih  
29 institucija, sem u slučaju kada je mentor disertacije iz druge institucije. Tada se mentor iz druge institucije upisuje  
30 pod rednim brojem 2, odnosno posle mentora sa FVM koji je pod rednim brojem 1.  
31

32  
33 II PODACI O KANDIDATU:

- 34  
35 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Lazar, Zoran, Milojević  
36 2. Datum rođenja, opština, Republika: 08.11.1991. godine, Beograd, Srbija  
37 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze\*:  
38  
39 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka\*:  
40

41 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

42  
43 “Identifikacija i filogenetska analiza Hepatitis E virusa kod svinja na klanicama u  
44 Srbiji“  
45

46 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,  
47 grafikona i sl.): Doktorska disertacija kandidata Lazara Milojevića napisana je na 92 strane  
48 kompjuterski kucanog teksta jasnim i razumljivim stilom. Disertacija sadrži sledeća poglavlja:  
49 Uvod (dve strane), Pregled literature (18 strana), Ciljevi i zadaci istraživanja (jedna strana),  
50 Materijal i metode istraživanja (9 strana), Rezultati istraživanja (33 strane), Diskusija (10  
51 strana), Zaključci (dve strane), Spisak literature (13 strana) i Prilog (3 strane). Disertacija je  
52 dokumentovana sa 35 tabela, 28 grafikona, 7 slika i jednim tabelarnim prilogom.  
53 Na početku disertacije dati su Sadržaj i Rezime na srpskom i engleskom jeziku.  
54

55 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis  
56 svakog poglavlja disertacije: uvoda-do 250 reči, pregleda literature-do 500 reči, cilja i  
57 zadataka istraživanja-nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –  
58 nije ograničeno, diskusije-do 100 reči, spiska referenci-navesti broj referenci u  
59 doktorskoj disertaciji):

1 U **Uvodu** kandidat ističe da hrana životinjskog porekla može sadržati širok spektar  
2 potencijalnih uzročnika oboljenja ljudi i kao takve predstavljati rizik po zdravlje krajnjeg  
3 potrošača. Evropska agencija za bezbednost hrane (*EFSA*) navodi da su virusi najčešći  
4 uzročnici epidemija putem hrane, kao i da su njihova komplikovana izolacija i teško  
5 kultivisanje u laboratorijskim uslovima, samo neki od razloga zbog kojih nisu značajno  
6 razmatrani u bezbednosti hrane. Poslednjih godina se razvija metodologija kojom je  
7 omogućena lakša izolacija, potvrđivanje i kultivisanje ove vrste patogenih mikroorganizama. U  
8 analizi monitoringa virusa hepatitisa E (HEV-a), Evropski centar za prevenciju bolesti (*ECDC*)  
9 izvestio je o povećanju broja potvrđenih slučajeva hepatitisa E kod ljudi u Evropi. Nakon što  
10 je prvi put izolovan i potvrđen kod svinja, 1997. god. Sjedinjenim Američkim Državama, dolazi  
11 se do saznanja da ova bolest može imati i zoonozni karakter. Takođe, dokazani su i  
12 sporadični slučajevi akutnog hepatitisa ljudi nakon konzumiranja sirove ili termički nedovoljno  
13 obrađene hrane. *EFSA* u svom izveštaju iz 2017. god., ukazuje da su domaće svinje osnovni  
14 rezervoar ovog virusa i da je jedan od najvažnijih puteva prenosa ovog virusa u razvijenim  
15 zemljama konzumiranje termički nedovoljno obrađenih jetri svinja, kao i proizvoda u čiji sastav  
16 ulazi jetreno tkivo. Zaražene svinje mogu biti upućene na klanje, budući da ne pokazuju  
17 vidljive simptome bolesti tokom *antemortem* veterinarskog pregleda. Takođe, identifikacija  
18 virusa uz pomoć savremenih molekularno-bioloških metoda ukazala je da kontaminirana  
19 hrana iz jedne države može daljim distribuiranjem izazvati pojavu bolesti bilo gde u svetu.  
20 Rizik od oboljevanja ljudi dodatno je povećan činjenicom da otkrivanje prisustva ovog virusa  
21 još uvek nije uključeno u obavezni plan monitoringa.

22  
23 U poglavlju **Pregled literature** prikazana su dosadašnja naučna saznanja o opštim  
24 osobinama virusa hepatitisa E, putevima transmisije, epidemiološkim podacima, kliničkoj slici,  
25 patogenezi i imunološkom odgovoru, dijagnostičkim metodama za izolaciju i potvrdu HEV-a,  
26 imunoprofilaksi, kao i preventivnim merama u lancu proizvodnje mesa svinja. Navodi se da  
27 HEV pripada porodici *Hepeviridae*, koja se sastoji iz dva roda: *Orthohepevirus* (koji inficira  
28 sisare i ptice) i *Piscihepevirus* (inficira pastrmke). Rod *Orthohepevirus* dalje se grana na četiri  
29 vrste A, B, C i D. *Orthohepevirus A* obuhvata 7 genotipova, od kojih samo genotipovi od 1-4  
30 mogu da prouzrokuju oboljenje ljudi. Genotip 3 izolovan je širom sveta iz uzoraka poreklom  
31 od ljudi i svinja i predstavlja najčešće izolovani genotip u Evropi. Svetska zdravstvena  
32 organizacija (*WHO*) ukazuje da se na godišnjem nivou infekcija hepatitisom E dijagnostikuje  
33 kod oko 20 miliona ljudi u svetu, pri čemu Azija i Afrika predstavljaju endemske regione, gde  
34 je izvor infekcije većinom kontaminirana voda. Ipak se sve češće beleže slučajevi oboljenja  
35 ljudi uzrokovani ovim virusom nakon konzumiranja kontaminirane hrane. Urbanizacija  
36 stanovništva, prelasci sa lokalnog na globalno orijentisano tržište hrane, trend sve učestalijih  
37 putovanja ljudi i transporta životinja, samo su neki od faktora koji su doveli do širenja i ovog  
38 virusa u sve delove sveta. Prema podacima *EFSA*-e, HEV je u evropskim zemljama tokom  
39 poslednjih deset godina izazvao oko 20 hiljada akutnih slučajeva oboljenja, sa oko 30 smrtnih  
40 ishoda. Simptomi koje se javljaju nakon infekcije ljudi ovim uzročnikom uglavnom su  
41 lokalizovani na digestivni trakt (gastroenteritis i hepatitis), dok u nekim slučajevima mogu biti  
42 zahvaćeni i drugi organi (srce, bubrezi). Opsežnim epidemiološkim studijama ustanovljeno je  
43 da je u zemljama EU kontaminirana hrana dominantni put prenosa ovog oboljenja, kao i da su  
44 glavni izvori HEV-a domaće, divlje svinje, kao i jelenska divljač. Istraživanjima u zemljama EU  
45 ustanovljeno je prisustvo HEV-a u ispitivanim uzorcima mesa, sirovih kobasica, jetrenih  
46 kobasica i drugih proizvoda od domaćih i divljih svinja, a takođe i na opremi u lancu  
47 proizvodnje mesa svinja. Ovaj patogen predstavlja sve važniji problem za javno zdravlje ne  
48 samo u nerazvijenim, već i u razvijenim i zemljama u razvoju.

49 Molekularno-biološka dijagnostika HEV-a uključuje više različitih metoda za izolaciju virusa iz  
50 određenog uzorka, ekstrakciju njegove RNK i amplifikaciju virusne RNK tehnikom RT-qPCR.  
51 *EFSA* je 2017. godine predložila standardni protokol koji dozvoljava upoređivanje različitih  
52 PCR produkata dobijenih upotrebom definisanih protokola za otkrivanje RNK poreklom iz  
53 HEV-a. Mreža evropskih laboratorija za ispitivanje HEV-a (*HEVNet*,  
54 <https://www.rivm.nl/en/hevnet>) definisala je ORF2e-2f regiona genoma HEV-a kao deo koji je  
55 najmanje podložan mutacijama i kao takav je najidealniji za sekvenciranje i dalju filogenetsku  
56 analizu.

57 Prevencija HEV-a kroz lanac hrane podrazumeva primenu dobre profilakse na nivou farmi  
58 svinja, jer svinje često i ne pokazuju kliničke simptome bolesti i upućuju se na klanicu, te  
59 njihovo meso i proizvodi ulaze u lanac ishrane ljudi. Odgovarajući sistem visokog nivoa  
60 biosigurnosnih mera predstavlja važnu meru u prevenciji hepatitisa E kod svinja. U zemljama

1 gde osnovni izvor infekcija prouzrokovanim HEV-om predstavlja hrana (jetra, meso, kao i  
2 proizvodi u čiji sastav ulazi jetreno tkivo), najbitnije je sprovesti dobru higijensku praksu kroz  
3 ceo lanac proizvodnje hrane, sa primenom svih procedura koje onemogućavaju unakrsnu  
4 kontaminaciju i prenošenje HEV-a preko opreme i površina u klanicama.  
5

6 **Cilj istraživanja** u okviru ove doktorske disertacije bio je da se primenom molekularno-  
7 bioloških tehnika izvrši otkrivanje prisustva, identifikacija i genotipizacija HEV-a u jetrama  
8 svinja na klanici i u maloprodaji na teritoriji Republike Srbije. Takođe cilj je bio i da se ispituju i  
9 brisevi sa radnih površina i opreme u klanicama, radi utvrđivanja eventualne transmisije  
10 virusa preko klanične opreme. Kod pozitivnih uzoraka, planirano je da se ustanovi  
11 opterećenost tkiva jetre ovim virusom, a daljom filogenetskom analizom utvrdi genetička  
12 povezanost između naših potvrđenih sekvenci HEV-a i onih ranije opisanih u svetu. Dodatni  
13 cilj bio je da se optimizuje metodologija za izolaciju HEV-a, ekstrakcija RNK i RT-qPCR  
14 tehnika potvrđivanja, kako bi se snizio limit detekcije i omogućilo smanjenje procenta lažno  
15 negativnih uzoraka.

16 Kako bi se ostvarili definisani ciljevi istraživanja prikupljeni su uzorci jetri i brisevi sa površina i  
17 opreme u kontaktu sa hranom sa klanica u Srbiji, kao i uzorci jetri iz maloprodaje, prema  
18 unapred definisanom planu; urađena je ekstrakciju virusne RNK optimizovanom  
19 metodologijom, zahvaljujući kojoj je prinos RNK u pozitivnim uzorcima bio značajno veći;  
20 metodom RT-qPCR ispitano je prisustvo HEV-a u pripremljenim uzorcima RNK poreklom od  
21 jetri i briseva površina u kontaktu sa hranom; definisana je regija i veličina oligonukleotidnog  
22 fragmenta koji je predstavljao matricu za amplifikaciju i sekvencioniranje; filogenetskom  
23 analizom ispitana je, na osnovu redosleda nukleotida dobijenih sekvenciranjem, genetička  
24 povezanost između referentnih sekvenci sa našim sekvencama iz pozitivnih uzoraka;  
25 ustanovljena je opterećenost tkiva jetre ovim virusom kod HEV pozitivnih uzoraka i dobijeni  
26 rezultati su sistematizovani, statistički obrađeni, uz uporednu analizu.  
27

28 U poglavlju **Materijal i metode** prikazani su detalji eksperimentalnog rada prema  
29 postavljenim zadacima istraživanja..  
30

#### 31 • **Prikupljanje i čuvanje uzoraka**

32 Uzorci jetri i briseva površina i opreme u kontaktu sa hranom prikupljeni su iz tri registrovane  
33 klanice koje se nalaze u tri različita okruga (Srem, Kolubara i Šumadija) naše zemlje. Uzorci  
34 su prikupljeni tokom godinu dana, a ceo period ispitivanja bio je podeljen na četiri kvartala  
35 (sezona). Prikupljeni uzorci jetre pripadali su jedinkama koje su nakon veterinarsko  
36 sanitarnog *ante* i *postmortem* pregleda procenjene kao klinički zdrave i upućene na klanje, a  
37 čije su meso i parenhimatozni organi procenjeni kao higijenski upotrebljivim za javnu  
38 potrošnju. Istovremeno, prikupljeni su i uzorci jetri iz maloprodajnih objekata sa teritorije  
39 pomenuta tri okruga. Stratifikacija uzoraka urađena je prema starosnom uzrastu svinja, a  
40 izabrane su one klanice u kojima se, nakon veterinarsko sanitarnog pregleda, obavljalo klanje  
41 mlađih (do 3 meseca) i starijih kategorija svinja (preko 6 meseci). Pored toga, stratifikacija je  
42 izvršena i na osnovu pola životinja. Tkivo za analizu uzorkovano je iz režnja jetre (*lobus*  
43 *hepaticus dexter medialis*) na kome se nalazila žučna kesica i koja je odstranjena pre  
44 uzorkovanja. Postupak uzorkovanja urađen je u aseptičnim uslovima korišćenjem sterilnih  
45 rukavica i noževa. Uzorkovano je 30 g ± 10 g jetrenog tkiva za svaki uzorak. Uzorci su  
46 stavljeni u 50 mL Falcon tube i dopremljeni u laboratoriju u ručnim friziderima pri temperaturi  
47 od 4 ± 2 °C. Uzorkovanje briseva sa površina u proizvodnom pogonu urađeno je prema ISO  
48 18593:2018- *Mikrobiologija lanca hrane - Horizontalne metode za tehnike uzimanja uzoraka*  
49 *sa površine*. U laboratoriji, svi uzorci čuvani su pri temperaturi od -20°C do početka rada.  
50

#### 51 • **Ekstrakcija virusne RNK-a**

52 Zamrznuti uzorci svinjskih jetri ostavljeni su pri sobnoj temperaturi tokom 30 minuta da bi se  
53 odledili pre daljeg rada. Pomoću sterilnih makaza i pincete od svakog uzorka jetre odvojen je  
54 deo tkiva, mase oko 100 mg i prenesen u posebnu epruvetu od 2 mL (Sarstedt, Nemačka).  
55 Nakon toga, u svaki uzorak dodato je po 10 µL Mengo virusa (vMC0) koji je predstavljao  
56 kontrolni materijal za praćenje efikasnosti ekstrakcije RNK. U svaku epruvetu pipetirano je po  
57 1 mL Trizola (Invitrogen, USA) i po 600 µg cirkonijumskih kuglica dijametra 0,1 mm. Uzorci  
58 su, zatim, homogenizovani u homogenizatoru BeadBeater (Biospec, USA), a potom  
59 centrifugirani na 12.000 ×g tokom 10 minuta pri temperaturi od 4°C (Eppendorf, Nemačka).  
60 Dobijeni supernatant prebačen je u nove epruvete koje su u sebi sadržale PLG (phase lock

1 gel) proizvođača 5 Prime, Nemačka. U sledećoj fazi dodato je 200 µL hloroforma i nakon  
2 inkubacije od 5 minuta, uzorci su ponovo centrifugirani na 12.000 ×g tokom 10 minuta pri 4°C.  
3 Nakon centrifugiranja gornja, vodena faza supernatanta, pažljivo je izdvajana u nove  
4 epruvetice od 2 mL i čuvana pri -70°C do početka postupka izolacije RNK.

5 Postupak izolacije virusne RNK iz briseva uzetih sa površina iz klanica počinjao je  
6 vorteksovanjem briseva u trajanju od 30 s. Suspenzija iz briseva zatim je bila prebačena u  
7 nove epruvete od 2 mL i potom centrifugirana na 2.500 ×g tokom 15 min na 4°C. Dobijeni  
8 supernatant prebačen je u nove epruvete koje su u sebi sadržale PLG i dalji tok ekstrakcije  
9 virusne RNK iz briseva pratio je postupak ekstrakcije virusa iz uzoraka jetre.

#### 10 • **Izolacija virusne RNK**

11 Izolacija virusne RNK izvedena je korišćenjem komercijalnog kompleta za ekstrakciju RNeasy  
12 Mini Kit (Qiagen, Nemačka) prema laboratorijski optimizovanom protokolu. Početni materijal  
13 za izolaciju virusne RNK predstavljao je supernatant koji je prethodno dobijen postupkom  
14 ekstrakcije virusa i čuvan pri -70°C. Zapremina svakog pojedinačnog uzorka bila je 400 µL.  
15 Potom je u iste epruvete dodata jednaka zapremina radnog rastvora RTL pufera iz kompleta,  
16 a zatim ista zapremina 70% etanola. Negativna i pozitivna kontrola takođe su bile deo  
17 postupka izolacije RNK. U epruveti koja je predstavljala negativnu kontrolu, dodato je 400 µL  
18 vode, dok je u epruvetu koja je predstavljala pozitivnu kontrolu dodato 400 µL supernatanta  
19 jetre koja je prethodno bila sigurno dokazana kao pozitivna na prisustvo HEV genotipa 3a.

20 Uzorci su vorteksovani tokom 30 s, a zatim je otpipetirano po 700 µL u RNeasy kolone.  
21 RNeasy kolone zatim su centrifugirane na 8.000 ×g tokom 15 s. Dobijeni eluat (flow-through)  
22 je odbačen. Isti postupak ponovljen je sa preostalim zapreminom uzoraka. Zatim su u  
23 RNeasy kolone dodata dva različita pufera pomoću kojih se vršilo ispiranje i prečišćavanje  
24 RNK. Prvi pufer dodat je u zapremini od 700 µL, a uzorci su potom centrifugirani na 8.000 ×g  
25 tokom 15 s, nakon čega je odbačen eluat. Drugi pufer dodat je u zapremini od 500 µL  
26 centrifugiran na 8.000 ×g tokom 15 s, dok je eluat ponovo odbačen. Postupak sa drugim  
27 puferom ponovljen je još jednom, s tim da je centrifugiranje na 8.000 ×g trajalo 2 minuta.  
28 Produženo vreme centrifugiranja imalo je za cilj da se maksimalno eluira pufer i u što većoj  
29 meri smanji rezidualna zapremina tečnosti na RNeasy kolonama. U RNeasy kolone dodato je  
30 po 40 µL „RNA-se free“ vode (Ambion, USA) i one su potom centrifugirane na 8.000 ×g tokom  
31 1 minuta. Postupak je ponovljen još jednom, pri čemu je zapremina vode koja je naknadno  
32 dodata iznosila 30 µL. Dobijeni supernatant prebačen je u nove epruvete od 1,5 mL i čuvan  
33 pri -70°C do izvođenja RT-qPCR reakcije.  
34

#### 35 • **Otkrivanje RNK poreklom od HEV-a primenom RT-qPCR metode**

36 Uzorci i kontrole dalje su podvrgnuti procesima reverzne transkripcije i lančane reakcije  
37 polimerazom u jednom koraku, a rezultati ovog postupka mogli su se pratiti u realnom  
38 vremenu. Za ovaj proces korišćen je komercijalni komplet „UltraSense One-step Quantitative  
39 RT-qPCR System“ (Life Technologies, USA). Prajmeri HEV3-f i HEV3-r, kao i HEV3 proba  
40 predstavljaju deo sekvenci u preklapajućem ORF2/3 regionu genoma HEV-a (Jothikumar i  
41 sar., 2006). Prajmer HEV3-f delimično je izmenjen, a ova naša modifikacija predstavlja  
42 zamenu guanina (G) sa degenerisanim nukleotidom „R“ na poziciji 5323 (pozicija nukleotida  
43 utvrđena na osnovu genoma HEV koji je zaveden u GenBank pod pristupnim brojem  
44 AF060669). HEV3-r prajmer i HEV3 proba nisu modifikovane. TaqMan proba obeležena je na  
45 krajevima sa fluorescentnom bojom FAM/BHQ1 (Microsynth, Švajcarska). Za molekularnu  
46 identifikaciju RNK HEV-a korišćeni su sledeći prajmeri: 1. JVHEVF (fw), sekvenca (5'-3') -  
47 GGT GGT TTC TGG RGT GAC; 2. JVHEVR (rev), sekvenca (5'-3') - AGG GGT TGG TTG  
48 GAT GAA; 3. JVHEVP (proba), sekvenca (5'-3') -TGA TTC TCA GCC CTT CGC (Jothikumar i  
49 sar., 2006).

50 RT-qPCR reakcija za svaki uzorak i kontrole urađena je u zapremini od 25 µL (20 µL  
51 reakcione smeše i 5 µL uzorka). Reakciona smeša sastojala se od po 5 µL 5× reakcionog  
52 pufera (RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR System, Invitrogen, USA), 1,25 µL  
53 smeše enzima, 0,5 µM forward prajmera, 0,9 µM reverse prajmera, 0,25 µM probe i PCR  
54 čiste vode do zapremine od 20 µL.

55 Reakcije su izvođene na optičkim mikro pločama od 96 bunarčića (Agilent, SAD) na RealTime  
56 PCR aparatu AriaMX (Agilent, USA). Reverzna transkripcija i amplifikacija RNK urađena je  
57 prema sledećim vremenskim i temperaturnim režimima:

- 58 • Reverzna transkripcija pri 55° C u trajanju od 60 minuta;
- 59 • Inicijalna aktivacija enzima na 95° C tokom 5 minuta i

- 45 ciklusa [1 ciklus sastoji se od: denaturacije (95° C, 15 s), hibridizacije prajmera i proba (60° C, 60 s) i elongacije (65° C, 60 s].

Pomoću kompjuterskog softvera proizvođača uređaja i specifičnih dijagrama za preračunavanje nivoa fluorescencije omogućena je vizuelizacija dobijenih pozitivnih segmenata genoma. Pozitivni rezultati manifestovali su se pojavom eksponencijalne krive, što je predstavljalo rezultat umnožavanja ispitivanog PCR produkta (segmenta genoma) u svakom ciklusu. Sa rastom broja PCR produkata, dolazilo je i do rasta eksponencijalne krive. Budući da u negativnoj kontroli i negativnim uzorcima nije bilo prisustva ispitivanog PCR produkta, rast eksponencijalne krive izostao je u tim uzorcima. Mengo virus, koji je korišćen kao procesni materijal za kontrolu efikasnosti ekstrakcije RNK, nepatogen je virus koji pripada familiji *Picornaviride*, a poseduje osobine koje su slične HEV virusu. U samoj reakciji upotrebljena je specifična TaqMan reakciona smeša za vMC0, zapremine od 20 µL u koju je dodavano po 5 µL ekstrakta nukleinske kiseline Mengovirusa, prema standardu ISO 15216-2:2019: Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 2: Method for detection.

- **Sekvenciranje dela genoma HEV-a**

Za potrebe karakterizacije i genotipizacije dobijenih izolata virusa hepatitisa E je izvršeno sekvenciranje dela genoma virusa u oblasti ORF2 (ORF2e+ORF2f). U prvom koraku virusna RNK prepisana je procesom reverzne transkripcije (RT) u komplementarnu DNK, budući da RNK ne može da se koristi kao matrica za PCR, jer Taq polimeraza kao matricu koristi isključivo jednonačani molekul DNK. Za process reverzne transkripcije korišćen je komercijalni kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) sa nasumičnim heksamerima. Sastavi reakcionih smeša i temperaturni protokoli prikazani su u tabelama 3-5 u poglavlju Materijal i metode doktorske disertacije. Reakciona smeša I inkubirana je pri 65°C tokom 5 minuta, a zatim ohlađena na ledu tokom 2 minuta. Potom je pripremljena II reakciona smeša. Po 10 µL reakcione smeše I i II zajedno je pomešano u ependorf tubicama od 200 µL i inkubirano prema temperaturnom protokolu za sintezu komplementarne DNK. Zatim je iz dobijene komplementarne DNK virusa hepatitisa E amplifikovan fragment DNK koji je umnožen pomoću forvard prajmera (GAGGAGGAAGCTACCTC) i reverse prajmera (GGAGAAGGAGTTGGTGC), kao i korišćenjem Amplitaq 360 MasterMix kita (Applied Biosystems, USA), a sastav reakcione smeše naveden je u tabeli 6. Proces amplifikacije izvodio se pod sledećim uslovima: 2 minuta pri 50°C (dekontaminacija), 5 minuta pri 95°C (inicijalna denaturacija), a zatim 40 ciklusa od 30 sekundi pri 95°C, 20 sekundi pri 60°C i 15 sekundi pri 72°C. Amplifikacija virusne DNK izvršena je na aparatu AB2720 (Applied Biosystems, USA). U cilju kontrole odvijanja procesa amplifikacije, kao i kontrole kontaminacije, uz uzorak je pripremana pozitivna kontrola (HEV pozitivni uzorak, Genbank acc. no. MG051653) i negativna kontrola (NT, eng. No Template). Proizvodi PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu (Thermo Fisher Scientific, USA), pri 100 V tokom 60 minuta. Nakon dobijanja pozitivnog rezultata na agaroznom gelu (produkata očekivane veličine), u cilju sekvenciranja izvršeno je prečišćavanje PCR produkata upotrebom komercijalnog kompleta QIAquick DNA purification kit (Qiagen, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Upotrebom ovog kita, prečišćavanje PCR produkata odvijalo se u ultrafiltracionim spin kolonama. U prvom koraku vršila se apsorpcija umnožene DNK za površinu silicijumske membrane u prisustvu pufera (pH < 7,5) i visoke koncentracije soli. Tokom faze adsorpcije prajmeri i ostale nečistoće (nevezani nukleotidi, agarozna, SYBR Green boja, deterdženti i soli) prolazili su kroz kolonu, ne vezujući se za silicijumsku membranu. Rezidue soli ispirale su se puferom PE, koji sadrži etanol. Višak PE pufera uklanjao se centrifugiranjem. Elucija DNK izvršena je EB puferom (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Kvalitet prečišćenih fragmenata proveravan je na 1,5 % agaroznom gelu. Koncentracija i čistoća eluata određivana je merenjem apsorbance na spektrofotometru (Eppendorf, Nemačka) pri 260 nm i 280 nm. Sekvenciranje je izvedeno korišćenjem dual chain Sanger sequencing kapilarne tehnike na aparatu 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) u kompaniji Microsynth AG u Švajcarskoj.

- **Određivanje filogenetske srodnosti**

Za potrebe ovog istraživanja, 56 uzoraka, koji su bili pozitivno identifikovani na prisustvo virusa hepatitisa E, a u cilju genotipizacije, kao i detaljnije molekularne analize, pripremljeni su za sekvenciranje. Uzorci su sekvencirani celom dužinom amplikona metodom po Sangeru korišćenjem GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) kita (Beckman Coulter,

1 USA) i automatskog DNK sekvencera (Beckman Coulter, USA) u laboratoriji Microsynth,  
2 Švajcarska. Za sekvenciranje su upotrebljeni isti prajmeri, koji su korišćeni i za proces  
3 amplifikacije. Eksperimentalno dobijene nukleotidne sekvence analizirane su u cilju provere  
4 kvaliteta sekvenciranja. Sekvence su proverene u oba pravca pomoću on-line programa  
5 Clustal Omega, a istim programom izvršeno je upoređivanje (engl. alignment) dobijenih  
6 sekvenci. Ovako obrađena kompletna sekvenca je u cilju identifikacije dalje analizirana  
7 upotrebom BLAST programa (engl. Basic Local Alignment Search Tool), a konsenzus  
8 sekvence su upoređene sa sekvencama odgovarajućeg ORF2 regiona genoma virusa  
9 hepatitisa E dostupnim u „GenBank“ - bazi podataka (National Center for Biotechnology  
10 Information, NCBI database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Filogenetska analiza u prvom  
11 koraku obuhvatala je poravnavanje skupova sekvenci, sa ciljem da broj neuparenih mesta u  
12 ispitivanim sekvencama bude što manji, primenom CLUSTAL W algoritma u okviru online  
13 programa PAUP (Phylogenetic Analysis Using PAUP). Algoritam maksimalne verovatnoće  
14 (engl. Maximum likelihood) i algoritam pridruživanja taksona (engl. Neighbor joining) u  
15 programu MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) upotrebljeni su za procenu  
16 evolutivne srodnosti sekvenci, određivanje njihove evolutive udaljenosti i konstrukciju  
17 filogenetskih stabala (Kumar i sar., 2018). Butstrep analiza (engl. Bootstrap) je urađena u  
18 većem broju ponavljanja (1000) u cilju provere stabilnosti i izračunavanja statističke podrške  
19 topologiji stabla. Za određivanje matrice nukleotidne udaljenosti korišćen je Kimura  
20 dvoparametarski model sa odnosom tranzicija/transverzija od 2.0. Bootstrap vrednosti > 70  
21 smatrane su signifikantnim. U cilju definisanja filogenetskih odnosa ispitivanih izolata virusa  
22 hepatitisa E iz Srbije u odnosu na izolate ovih virusa iz Evrope i ostalih geografskih područja  
23 u svetu, u istraživanju su korišćene sekvence navedene u NCBI (engl. National Center for  
24 Biotechnology Information) bazi podataka. Sekvence korišćene u filogenetskoj analizi za  
25 potrebe ovog istraživanja prikazane su u tabeli 7 poglavlja *Materijal i metode* doktorske  
26 disertacije. Sve dobijene sekvence deponovane su u Genbank-u i dodeljeni su im pristupni  
27 brojevi

#### 28

#### 29 • **Kvantifikacija HEV-a poreklom iz jetri**

30 Za određivanje broja kopija virusa u jetrenom tkivu, konstruisan je sintetički molekul (RNK  
31 transkript). Komplementarna DNK virusa hepatitisa E (Genbank acc. no. MG051653) veličine  
32 71 nukleotid klonirana u pEXA2 vektor (Eurofins, Nemačka) i klonirana u bakteriji E. coli One  
33 Shot aTOP10F (Invitrogen, USA). Korišćenjem Plasmid Midi kit-a (Qiagen, Nemačka)  
34 prečišćena je plazmidska DNK, koja je potom digestirana HindIII enzimom (NEB, Canada), a  
35 dobijeni fragmenti su in vitro transkribovani pomoću MEGAscript kit-a (Ambion, USA) prema  
36 uputstvu proizvođača. Sintetisana RNK potom je tretirana DNA-se I enzimom radi eliminacije  
37 rezidualne plazmidske DNK, a zatim prečišćena pomenutim kitom RNeasy Mini kit (Qiagen,  
38 Nemačka). Sintetisana RNK kvantifikovana je merenjem apsorbance pri 260 i 280 nm  
39 pomoću aparata NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) i formule  $GC = \frac{[masa (g) \times 6,023 \times 10^{23}]}{[dužina (bp) \times 320,5]}$ . RNK je pipetirana u volumenima od po 50  $\mu$ L, pri čemu  
40 je broj GC iznosio 109 gc/  $\mu$ L. Uzorci su do početka rada čuvani pri temperaturi od - 80°C.  
41 Prilikom određivanja broja kopija virusa napravljena su decimalna razređenja sintetičke RNK,  
42 koja su u duplikatu ispitivana na RT-qPCR aparatu zajedno sa pozitivnim uzorcima. Na  
43 osnovu dobijenih Ct vrednosti duplikata razređenja standarda, u softveru Microsoft Excel  
44 2019 konstruisana je regresiona kriva, na osnovu koje je jednostavnom ekstrapolacijom  
45 utvrđen broj kopija virusa u tkivu.

#### 46

#### 47

#### 48 • **Statistička obrada dobijenih rezultata ispitivanja**

49 Za poređenje broja pozitivnih i negativnih uzoraka korišćen je Hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) ili Fišerov  
50 egzaktni test. Normalna raspodela podataka o broju genomskih kopija po gramu uzorka  
51 testirana je koristeći Shapiro - Wilk test normalnosti. Budući da uzorci nisu normalno  
52 distribuirani (Shapiro - Wilk test,  $p < 0,05$ ), za poređenje grupa je korišćena Kruskal-Valisova  
53 analiza varijanse (Kruskal-Wallis analysis of variance). U slučaju kada je postojala statistički  
54 signifikantna razlika između grupa, parovi grupa međusobno su poređeni putem Dunn's testa.  
55 Statistička analiza izvedenog eksperimenta urađena je u statističkom paketu GraphPad Prism  
56 verzija 6.00 za Windows, (GraphPad Software, San Diego, California, USA)  
57 [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) i aplikaciji MS Excel.

58

59 U poglavlju **Rezultati ispitivanja** navodi se najpre da je u okviru izrade ove disertacije  
60 razvijena i optimizovana metodologija za efikasnu ekstrakciju i pouzdano otkrivanje RNK

1 poreklom iz virusa hepatitisa E. Optimizacija metode rezultovala je povećanjem volumena  
2 intracelularnog sadržaja hepatocita usled mehaničke destrukcije membrana, inhibicijom  
3 tkivnih RNA-za (delovanjem Trizola i  $\beta$ -merkaptopetanolu) i povećanjem čistoće ekstrakta RNK  
4 (višestrukim uklanjanjem RT-qPCR inhibitora i totalnom separacijom RNA od kontaminirajućih  
5 proteina i DNA). Za procenu efikasnosti metode iz ove disertacije, korišćena je komparacija  
6 sa metodom koju je opisala Lupulović, 2013. Kao kriterijum za procenu korišćen je procenat  
7 efikasnosti ekstrakcije (EE) eksterne procesne kontrole (Mengovirus - vMC0). Limit  
8 prihvatljivosti metode iznosio je  $EE \geq 3\%$ . Efikasnost ekstrakcije metode razvijene u ovoj  
9 disertaciji iznosila je  $67,6 \pm 10,2\%$ , dok je kod komparativne metode bio  $35,23 \pm 8,30\%$ , te je  
10 utvrđena statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) između ispitivanih metoda ekstrakcije virusne  
11 RNK.

### 12 ***Prisustvo, zastupljenost i statistička analiza HEV-a uzoraka jetri svinja na klanicama***

13 Od ukupno 900 testiranih uzoraka jetri svinja poreklom iz klanica, prisustvo HEV-a utvrđeno je  
14 kod 261 (29%) uzoraka kod prasadi (do 3 meseca starosti), dok kod svinja starijih od 6  
15 meseci nije ustanovljen, te je postojala statistički značajna razlika između ispitivanih  
16 starosnih kategorija ( $p < 0,001$ ). U starosnoj kategoriji prasadi do 3 meseca HEV je utvrđen  
17 kod 44% ispitivanih uzoraka jetre (261).

18 Statističkom analizom obrađenih uzoraka prema polu, ustanovljeno je da od ukupnog broja  
19 (448) uzoraka od jedinki muškog pola 130 (29,02%) je bilo pozitivno. Analizirajući ženski pol,  
20 od ukupno 452 uzorka, pozitivnih uzoraka na HEV-a bilo je 131 (28,98%). Daljom analizom  
21 podataka utvrđeno je da između polova nije bilo velikih varijacije, samim tim nisu ni  
22 ustanovljene statistički značajne razlike.

23 Analizom teritorijalne distribucije, kod sva tri okruga ispitivan je isti broj uzoraka (75). U  
24 Šumadijskom okrugu je utvrđeno 14 (4,67%) pozitivnih uzoraka, a u Kolubarskom 100  
25 (33,33%). Treći okrug koji je bio obuhvaćen istraživanjem bio je Sremski i u njemu je  
26 ustanovljeno 147 (49,00%) pozitivnih uzoraka. Signifikantne razlike ( $p < 0,001$ ) javile su se  
27 između svih ispitivanih okruga. Najveći procenat pozitivnih uzoraka zabeležen je u Sremskom  
28 okrugu, dok je najmanji broj utvrđen u Šumadijskom okrugu.

29 Analizirajući sezonsku distribuciju HEV-a kod uzoraka jetri sa linije klanja, ustanovljene su  
30 signifikantne razlike između većine ispitivanih sezona. U zimskom periodu, od ukupnog broja  
31 ispitivanih uzoraka (225), utvrđena su 74 (32,89%) pozitivna uzorka. Tokom proleća, bilo je  
32 51 (22,67%), tokom leta 84 (37,33%) i tokom jeseni 52 (23,11%) pozitivna uzorka. Veći  
33 procenat pozitivnih uzoraka zabeležen je u sezonama zime i leta, dok je tokom proleća i  
34 jeseni zabeležen značajno manji procenat. Statistički značajne razlike bile su na nivou  $p < 0,05$   
35 između zime/proleća i zime/jeseni, dok su između sezona proleće/leto i leto/jesen iznosile  
36  $p < 0,001$ .

37 Analizirajući teritorijalnu distribuciju tokom sezona, tokom zimskog perioda je ustanovljena je  
38 signifikantna razlika ( $p < 0,001$ ) između Šumadijskog i Kolubarskog, kao i između Šumadijskog  
39 i Sremskog okruga. Tokom proleća, u Šumadijskom i Kolubarskom okrugu utvrđena je niska  
40 prevalencija HEV-a (6 -8,00% i 4-5,33%), dok je u Sremskom okrugu prisustvo ovog virusa  
41 bilo značajno učestalije (41-54,67%). Tokom letnje sezone, u Šumadijskom okrugu nije  
42 ustanovljeno prisustvo HEV-a, u Kolubarskom okrugu 44 uzorka (58,67%) je bilo pozitivno, a  
43 u Sremskom 40 (53,33%) Analizirajući okruge tokom letnje sezone, ustanovljena je značajna  
44 razlika ( $p < 0,001$ ) između Šumadijskog i Kolubarskog, kao i između Šumadijskog i Sremskog  
45 okruga. Tokom jeseni, u Šumadijskom okrugu ustanovljeno je prisustvo HEV-a kod 6,67%  
46 uzoraka, u Kolubarskom 17 (22,67%) i u Sremskom okrugu 30 (40,00%) uzoraka.  
47 Analizirajući prevalenciju HEV-a tokom jeseni, a prema okruzima, ustanovljena je statistički  
48 značajna razlika između svih ispitivanih okruga (Šumadijski/Sremski, Šumadijski/Kolubarski  
49 ( $p < 0,001$ ), i Kolubarski/Sremski ( $p < 0,05$ )).

50 Analizom dobijenih rezultata tokom četiri sezone, a na osnovu teritorijalne distribucije,  
51 možemo zaključiti da je u Šumadijskom okrugu prevalencija HEV-a bila najniža. U sve četiri  
52 sezone procenat pozitivnih kretao se od 0% do 8% i bio je značajno manji u odnosu na  
53 Sremski i Kolubarski (osim proleća). Sremski okrug je tokom celokupnog istraživanja bio  
54 okrug sa najvišim procentom pozitivnih uzoraka. Prevalencija se u ovom okrugu, tokom  
55 sezona kretala u intervalu od 40% do 54,67%. Kolubarski okrug bio je region u kom su  
56 zabeležene najveće varijacije u prevalenciji među sezonama, pri čemu je najmanji procenat  
57 pozitivnih zabeležen je tokom prolećne sezone (5,3%), dok je letnja sezona bila period u kom  
58 je ustanovljen najveći procenat pozitivnih uzoraka (58,67%).

1 Budući da su svi pozitivni uzorci jetri svinja sa linije klanja bili poreklom od svinja mlađih od 3  
2 meseca, posebno je statistički obuhvaćena i analizirana ova grupa uzoraka (600). Dobijeni  
3 rezultati pokazali su da osim prevalencije, kod pojedinih analiza utvrđene su i razlike u  
4 nivoima značajnosti.

5 Statističkom analizom uzoraka na osnovu polova, ustanovljeno je da je od ukupnog broja  
6 (296) uzoraka jetri od jedinkih muškog pola, pozitivnih na virus bilo 130 (43,92%), a od 304  
7 uzorka od jedinki ženskog pola, bilo je pozitivno 131 (43,09%), pri čemu se signifikante razlike  
8 nisu javile.

9 Analizom teritorijalne distribucije HEV-a uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom  
10 iz klanica obrađeno je po 200 uzoraka iz svakog od tri okruga. Od ukupnog broj uzoraka  
11 statističkom analizom ustanovljeno je da je u Šumadijskom okrugu bilo 14 (7,00%) pozitivnih  
12 uzoraka na ispitivani virus. Prilikom analiziranja Kolubarskog okruga, utvrđen je jednak broj  
13 pozitivnih i negativnih uzoraka – 100 (50%). Prisustvo virusa i u Sremskom okrugu  
14 ustanovljeno je kod 147 (73,50%) uzoraka. Statistički signifikantne razlike ( $p < 0,001$ ) javile su  
15 se između svih ispitivanih okruga.

16 Analiza sezone distribucije HEV-a uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom iz  
17 klanica ukazala je na statistički signifikantne razlike ( $p < 0,001$ ) između godišnjih doba  
18 proleća/leta i leto/jesen i zime/proleća kao i između sezona zima/jesen ( $p < 0,05$ ).

19 Analizom teritorijalne distribucije HEV-a po sezonama uzoraka jetri od svinja mlađih od 3  
20 meseca poreklom iz klanica ispitano je po 50 uzoraka iz svakog okruga za svako godišnje  
21 doba. Ustanovljena je statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) između Šumadijskog i  
22 Kolubarskog, kao i između Šumadijskog i Sremskog okruga tokom zimskog perioda. U  
23 prolećnoj sezoni statistički značajna razlika ( $p < 0,001$ ) javila se između Šumadijskog i  
24 Sremskog, kao i između Kolubarskog i Sremskog okruga, a u letnjoj između Šumadijskog i  
25 Kolubarskog, kao i između Šumadijskog i Sremskog okruga. Tokom jeseni između  
26 Šumadijskog i Sremskog, Šumadijskog i Kolubarskog ustanovljena je statistički značajna  
27 razlika ( $p < 0,001$ ), kao i između Kolubarskog i Sremskog ( $p < 0,05$ ).

28 **Prisustvo, zastupljenost i statistička analiza HEV-a iz uzoraka jetri iz maloprodaje**

29 Obradom dobijenih podataka poreklom od uzoraka jetri (60) iz maloprodajnih objekata,  
30 ustanovljeno je prisustvo HEV-a kod 3 (5%) uzorka, dok je 57 (95%) bilo negativno. U letnjem  
31 i jesenjem periodu nisu ustanovljeni pozitivni uzorci. Budući da su tokom zimske sezone  
32 utvrđena dva pozitivna, a tokom prolećne jedan pozitivan uzorak, statistički signifikantne  
33 razlike nisu se javile između ispitivanih godišnjih doba ( $p > 0,05$ ).

34 **Analizom dobijenih rezultata uzoraka briseva sa površina i oprema** na klanici koje dolaze  
35 u kontakt sa jetrama svinja (nož, masat, metalni sto, PVC daska, plastična lodna) utvrđeno je  
36 prisustvo HEV-a kod 13 uzoraka (22%), dok je negativno bilo 47 (78%) briseva. Statistička  
37 analiza ispitivanja briseva sa linije klanja na prisutvo HEV-a vršena je na osnovu sva četiri  
38 godišnja doba. Broj obrađenih uzoraka briseva iznosio je 15 po svakom godišnjem dobu. Od  
39 ukupnog broj uzoraka, statističkom analizom ustanovljeno je da je u toku zime bilo 3 (20,00%)  
40 pozitivna, tokom proleća 5 (33,33%), letnjeg perioda 4 (26,67%) i u jesenjem periodu 1  
41 (6,67%) pozitivan uzorak brisa. Statistički značajne razlike ustanovljene između ispitivanih  
42 godišnjih doba ( $p > 0,05$ ).

43 Statistička analiza uzoraka briseva sa linije klanja na prisustvo HEV-a izvršena je i na osnovu  
44 okruga iz kog potiču brisevi, pri čemu je broj ispitivanih uzoraka sa površina iznosio je 20  
45 briseva po svakom okrugu. Dobijeni rezultati pokazali su da u Šumadijskom okrugu nije  
46 utvrđeno prisustvo HEV u uzorcima briseva. U Kolubarskom okrugu bilo je 3 (15,00%)  
47 pozitivnih uzoraka briseva, a u Sremskom okrugu utvrđen je najveći broj pozitivnih uzoraka 10  
48 (50,00%). Statistički značajna razlika javila se između Šumadijskog i Sremskog okruga  
49 ( $p < 0,001$ ), kao i Kolubarskog i Sremskog okruga ( $p < 0,05$ ).

50 **Genetička identifikacija i filogenetska analiza izolata HEV-a**

51 Za sekvenciranje i genotipsku karakterizaciju izabrano je 56 izolata virusa hepatitisa E koji su  
52 pokazali najmanje Ct vrednosti u RT-qPCR-u, odnosno imali najveći broj kopija virusa, vodeći  
53 pri tome računa o ravnomernoj zastupljenosti po okrugu, sezoni, kao i vrsti uzorka. Nakon  
54 sekvenciranja, obradom dobijenih elektroferograma, zadržane su nukleotidne sekvence  
55 ukupno 52 izolata virusa hepatitisa E, dok su sekvence dobijene iz 4 uzorka (SRB-HEV-  
56 133K-2020, SRB-HEV-55R-2020, SRB-HEV-62S-2020 i SRB-HEV-76S-2020,) odbačene  
57 zbog lošeg kvaliteta elektroferograma. Posle poravnanja, sekvence su skraćene na dužinu od  
58 493 bazna para. U filogenetsko stablo, konstruisano na osnovu sekvence ORF2 regiona su,  
59 osim sekvenci dobijenih iz odabranih pozitivnih uzoraka, uključene i referentne sekvence  
60 virusa hepatitisa E (preuzete iz HEVNET-a) radi verodostojnog utvrđivanja pripadnosti naših



1 izolata pojedinačnim subgenotipovima. Na filogenetskom stablu se uočavaju četiri (4) glavna  
2 klastera. Klaster I obuhvata 43 primoizolata virusa hepatitisa E koji pripadaju genotipu HEV-3  
3 i subgenotipu HEV-3a. Ispitivanjem matrice genetičkih distanci između izolata virusa HEV-3a  
4 dobijenih analizom sekvenci ORF2 regiona utvrđeno je da je prosečna genetička udaljenost  
5 6,5%, najmanja 0%, a najveća 13,1%. Određene sekvence iz uzoraka, poreklom iz istih  
6 okruga apsolutno se ne razlikuju (0% genetičke udaljenosti), a to su: 115SH-121SH, 149S-  
7 150S, 169K-173K, 185S-162S, 191S-173S, 43S-25S, 45S-25S, 45S-43S, 73K-51K i 82K-  
8 67K.

9 Nasuprot tome, kod određenog broja parova izolata genetička udaljenost veća je od 10%. To  
10 je naročito izraženo za sledeće izolate: 110S-AF, 40K-15R, 48K-15R, 17S-169K, 40K-169K,  
11 48K-169K, 51K-169K, 73K-169K, 143SH-173K, 48K-173K, 51K-173K, 95K-40K i 95K-48K.

12 Na osnovu dobijenih rezultata ustanovljeno je da postoji značajna genetička udaljenost  
13 između sekvenci dobijenih iz uzoraka prikupljenih u istoj sezoni, ali sa različitim geografskog  
14 porekla. Tako je zabeležena genetička udaljenost veća od 10% između Šumadijskog i  
15 Kolubarskog (143SH-114K; 143SH-173K; 143SH-169K), kao i Sremskog u odnosu na  
16 Kolubarski (27S-40K; 27S-48K). Takođe, značajna genetička udaljenost sekvenci dobijenih iz  
17 uzoraka je zabeležena i između pojedinih sekvenci sa istog geografskog područja, ali različite  
18 sezone uzorkovanja (169K-114K; 173K-114K; 12K-169K; 17S-110S; 17S-173; 95K-114K).

19 Klaster II je obuhvatao 2 sekvence dobijene iz uzoraka, subgenotip 3c koji se genetički  
20 izrazito malo (< 5%) razlikuju od referentnog soja FJ705359.

21 Klaster III je obuhvatao 6 sekvenci virusa hepatitisa E, subgenotip 2a, koji su najbliži  
22 referentnom soju M74506. Ispitivanjem matrice genetičkih distanci između ovih sekvenci  
23 utvrđeno je da je najmanja genetička udaljenost 0%, a najveća 5,2%. Zanimljivo je da između  
24 svih 6 sekvenci iz uzoraka, genetička udaljenost skoro 0%, dok se u odnosu na referentu  
25 sekvencu razlikuju veoma malo – od 2,8 do 5,2%.

26 Klaster IV je obuhvata samo jednu sekvencu dobijenu iz uzorka, za koju filogenetskom  
27 analizom nije bilo moguće svrstavanje u određeni subgenotip. Radi se o sekvenci SRB-HEV-  
28 25SH-2020|HEV-3, za koju se sa verovatnoćom od 88% može potvrditi pripadanost genotipu  
29 HEV-3, a ispitivanjem genetičke udaljenosti utvrđeno je da je ova sekvencija najbliža  
30 klasteru HEV-3c, HEV-3h i HEV-3i.

31 **Kvantifikacija pozitivnih HEV-nih uzoraka iz tkiva jetri**

32 Analizom svih 264 pozitivnih uzoraka jetri tokom kvantifikacije prosečnog broja  $\log_{10}$   
33 genomskih kopija HEV-a po gramu tkiva jetre, prosečan broj u jetrama uzorkovanih sa klanica  
34 bio je 4,41 (sa standardnom devijacijom od 1,69), dok kod jetri poreklom iz maloprodaje  
35 iznosio 3,00 i bio u intervalu od 1,90 do 4,3.

36 Daljom statističkom obradom podataka na osnovu već definisanih stratifikacija uzoraka (po  
37 okruzima i sezonama) analizirajući deskriptivne statističke pokazatelje  $\log_{10}$  broja genomskih  
38 kopija/g HEV-a, ustanovljeno je da je medijana najvećeg broja  $\log_{10}$  kopija/g bila u Sremskom  
39 okrugu (4,30), sa rasponom prvog i trećeg kvartila od 3,57-5,76. Dobijeni rezultat je statistički  
40 značajno viši ( $p < 0,01$ ) u odnosu na Kolubarski i Šumadijski okrug, gde su medijane su  
41 iznosile 3,74 i 2,94. Koeficijent varijacije kod ispitivanih okruga bio je najniži kod Sremskog  
42 (35,11%), a najviši kod Šumadijskog okruga (47,86%). Daljom analizom deskriptivnih  
43 statističkih pokazatelja  $\log_{10}$  broja genomskih kopija/g HEV-a na onovu sezona, ustanovljeno  
44 je da je medijana najnižeg broja  $\log_{10}$  kopija/g bila u leto 3,87, sa rasponom prvog i trećeg  
45 kvartala od 3,43-4,84. Za razliku od toga, medijana najvećeg broja  $\log_{10}$  kopija/g bila je u  
46 proleće 4,18 (3,17-6,60). Između svih ispitivanih sezona nije utvrđena statistički značajna  
47 razlika ( $p > 0,05$ ). Ispitivani koeficijent varijacije bio je najviši tokom leta (41,67%), dok je tokom  
48 zime koeficijent varijacije bio najniži (29,68%). Analizirajući deskriptivne statističke  
49 pokazatelje  $\log_{10}$  broja genomskih kopija/g HEV-a tokom zimske sezone, ustanovljeno je da je  
50 medijana najvećeg broja  $\log_{10}$  kopija/g bila u Sremskom okrugu (4,38), sa rasponom prvog i  
51 trećeg kvartala od 3,94-4,67. Kada su upoređene medijane među okruzima, ustanovljena je u  
52 Sremskom okrugu statistički značajno viša ( $p < 0,01$ ) u odnosu na Kolubarski -3,81 (3,46-  
53 3,92). Koeficijent varijacije kod ispitivanih okruga bio je najniži kod Kolubarskog (19,26%), a  
54 najviši kod Šumadijskog okruga (56,73%). Analizirajući deskriptivne statističke pokazatelje  
55  $\log_{10}$  broja genomskih kopija/g HEV-a u proleće, ustanovljeno je da je medijana najvećeg  
56 broja  $\log_{10}$  kopija/g bila u Sremskom okrugu (4,86), sa rasponom prvog i trećeg kvartala od  
57 3,43-6,82, što je bilo statistički značajno više ( $p < 0,05$ ) u odnosu na Šumadijski okrug - 2,65  
58 (2,17-3,96). Koeficijent varijacije kod ispitivanih okruga bio je najniži kod Sremskog okruga  
59 (37,60%), a najviši kod Šumadijskog (56,44%), pri čemu statistički značajna razlika između  
60 ispitivanih grupa nije utvrđena. Analizirajući deskriptivne statističke pokazatelje  $\log_{10}$  broja

1 genomskih kopija/g HEV-a u jesen, ustanovljeno je da je medijana najvećeg broja log<sub>10</sub>  
2 kopija/g bila u Sremskom okrugu 4,55, sa rasponom prvog i trećeg kvartala od 3,76-5,58. U  
3 odnosu na prethodni okrug, u Šumadijskom okrugu medijana je iznosila 3,79 (2,24-4,75), što  
4 je statistički značajno niže (p<0,01) u odnosu na Sremski okrug. Koeficijent varijacije kod  
5 ispitivanih okruga bio je najniži kod Sremskog (27,69%), a najviši kod Šumadijskog okruga  
6 (52,78%).

7  
8 U poglavlju **Diskusija** kandidat kritički razmatra dobijene rezultate i poredi ih sa rezultatima  
9 drugih autora. Najpre se razmatra nalaz prisustva i zastupljenosti HEV-a u jetrama svinja  
10 poreklom sa klanica i maloprodaje, kao i u brisevima sa površina i opreme koji dolaze u  
11 kontakt sa jetrama. Potom se diskutuje o genetičkoj identifikaciji i filogenetskoj analizi  
12 dobijenih izolata HEV-a. Takođe se analitički razmatra kvantifikacija pozitivnih uzoraka jetre i  
13 na kraju diskutuje o riziku prenosa HEV-a na ljude konzumiranjem proizvoda od mesa koji  
14 sadrže svinjsku jetru i jačanju koncepta jednog zdravlja (*One Health, eng.*) .

15  
16 U **Spisku literature** kandidat je u doktorskoj disertaciji naveo 206 referenci koje je koristio  
17 tokom izrade svoje doktorske disertacije.

18  
19 U **Prilogu** je tabelarni prikaz matrice K2P genetičkih distanci između sekvenci virusa HEV-3a,  
20 dobijene analizom sekvenci ORF2 regiona.

## 21 22 VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj 23 disertaciji):

24  
25 Na osnovu sprovedenih istraživanja i razmatranja dobijenih rezultata zaključeno je sledeće:

- 26  
27 1. Ekstrakcija i detekcija virusne RNK urađena je optimizovanom  
28 metodologijom, kojom je postignuto smanjenje procenta lažno negativnih rezultata.
- 29 2. Potvrđena je različita geografska distribucija HEV-a u jetrama svinja na  
30 klanicama. Najveći procenat pozitivnih uzoraka utvrđen je u Sremskom okrugu (49%  
31 kod ukupnog broja uzoraka i 73,5% kod uzoraka prasadi mlađih od 3 meseca).
- 32 3. Nije ustanovljena statistički značajana razlika u broju pozitivnih uzoraka kod  
33 životinja različitog pola.
- 34 4. Ustanovljena je sezonska učestalost nalaza HEV-a u jetrama svinja. Tokom  
35 godine utvrđena su dva pika u prevalenciji, koja se javljaju tokom zimske i letnje  
36 sezone. Statistički značajno niži procenat pozitivnih uzoraka zabeležen je tokom  
37 prolećne i jesenje sezone.
- 38 5. Prisustvo HEV-a ustanovljeno je kod 22% uzoraka briseva sa površina i  
39 opreme na liniji klanja. Najveći broj pozitivnih nalaza (50%) bio je Sremskom okrugu.
- 40 6. Analizom uzoraka jetri iz maloprodajnih objekata, HEV je potvrđen kod 3  
41 uzorka od ukupno 60 ispitanih na prisustvo ovog virusa (5%).
- 42 7. Rezultati filogenetske analize pokazali su da postoji visok stepen sličnosti  
43 između nukleotidnih sekvenci dobijenih iz uzoraka u ovom istraživanju i onih već  
44 opisanih u svetu. Od 52 ispitanih sekvenci dobijenih iz uzoraka, 43 (82,7%) je  
45 pripadalo subgenotipu HEV-3a, pri čemu je prosečna genetička udaljenost između  
46 njih bila 6,5%. Dve sekvence (3%) pripadale su subgenotipu HEV-3c, njih šest  
47 (11,5%) svrstane su u HEV-2a, dok je jedna sekvenca (1,9%) pripadala genotipu 3,  
48 pri čemu nije bilo moguće precizno odrediti njen subgenotip (a najbliži je bio HEV-  
49 3c, HEV-3h i HEV-3i).
- 50 8. Rezultati kvantifikacije pozitivnih uzoraka pokazali su da je tkivo jetre u  
51 proseku bilo opterećeno sa 4,41 log<sub>10</sub> (2,5×10<sup>4</sup>) genomskih kopija HEV po gramu  
52 tkiva. Broj genomskih kopija po gramu se tokom celokupnog perioda istraživanja  
53 kretao u intervalu od 1,0 do 9,16 log<sub>10</sub>.
- 54 9. Statističkom obradom dobijenih podataka o broju genomskih kopija po  
55 gramu, a na osnovu geografskog porekla uzoraka, utvrđeno je da je medijana  
56 najvećeg broja genomskih kopija po gramu bila u Sremskom okrugu (4,30 log<sub>10</sub>) i  
57 statistički je bila značajno (p<0,01) viša u odnosu na preostala dva ispitivana okruga.
- 58 10. Dobijeni rezultati istraživanja ukazuju da je potrebno uspostaviti plan  
59 monitoringa prisustva HEV-a, kako kod životinja, tako i kod ljudi, u cilju podizanja  
60 nivoa bezbednosti jednog zdravlja (*One Health, eng.*).

1  
2 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**  
3 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavnjenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**  
4 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

5 Komisija smatra da su dobijeni rezultati ispitivanja u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima  
6 istraživanja i da zaključci ove doktorske disertacije proizilaze iz dobijenih rezultata. Dobijeni  
7 rezultati su prikazani tabelarno, grafički i uz pomoć slika, a njihov opis je dat logičnim  
8 redosledom, pregledno, jasnim i razumljivim stilom. Izvedeni zaključci su jasno formulisani i u  
9 skladu su sa postavljenim ciljevima i dobijenim rezultatima istraživanja.

10  
11 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

12  
13 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

14  
15 Doktorska disertacija kandidata je u potpunosti napisana u skladu sa obrazloženjem  
16 navedenim u prijavi teme.

17  
18 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

19  
20 Doktorska disertacija Lazara Milojevića sadrži sve bitne elemente u skladu sa zahtevima za  
21 završenu doktorsku disertaciju

22  
23 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

24  
25 Originalan doprinos nauci doktorske disertacije Lazara Milojevića su rezultati koji su  
26 otkrivanjem prisustva, identifikacijom i genotipizacijom HEV-a u jetrama svinja na klanici i u  
27 maloprodaji, kao i brisevima sa površina i opreme u kontaktu sa jetrom na klanicama,  
28 primenom molekularno-bioloških tehnika, doprineli uvidu o rasprostranjenosti i distribuciji  
29 ovog virusa na teritoriji Republike Srbije. Dokazivanje HEV-a u jetrama svinja koje se koriste  
30 u ishrani ljudi na tržištu Republike Srbije omogućilo je, po prvi put, detaljan uvid o  
31 zastupljenost ovog virusa, potencijalnu mogućnost infekcije ljudi ovim patogenom preko  
32 kontaminirane hrane kao i eventualnog prenosa virusa sa površina i opreme u klaničnoj  
33 industriji. Dalje, dobijeni rezultati su doprineli uvidu u stepen opterećenja tkiva jetre HEV-om,  
34 a svi dobijeni podaci se mogu koristiti za donošenje procene potencijalnog rizika po zdravlje  
35 potrošača ovim patogenim virusom putem kontaminirane hrane. Takođe, rezultati ovog  
36 istraživanja podstaći će još veći interes za ispitivanje HEV-a u različitim proizvodima od mesa  
37 svinja, utvrđivanje tačne infektivne doze, kao i doprineti razvoju eventualnog plana  
38 nacionalnog monitoringa prisustva HEV-a, kako kod životinja, tako i kod ljudi, u cilju podizanja  
39 nivoa jednog zdravlja (*One Health*, eng.). Realizacija ove disertacije omogućila je takođe i  
40 podizanje kapaciteta za razvoj ostalih molekularno-bioloških metoda dijagnostikovanja virusa  
41 u hrani.

42  
43 **4. Da li je mentor tokom provere originalnosti disertacije utvrdio neopravdano**  
44 **preklapanje teksta sa drugim publikacijama (odgovoriti sa da ili ne): NE**

45  
46 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**  
47 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**  
48 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov**  
49 **rada, naziv časopisa, impakt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu**  
50 **vrednovanja, i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**  
51 **Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22):**

- 52  
53 1. **Lazar Milojević**, Branko Velebit, Vlado Teodorović, Andrej Kirbiš, Tamaš Petrović,  
54 Neđeljko Karabasil and Mirjana Dimitrijević (2019). „Screening and Molecular  
55 Characterization of Hepatitis E Virus in Slaughter Pigs in Serbia“. *Food and*  
56 *Environmental Virology*, 11, 4, p:410-419

57  
58  
59 **X PREDLOG:**  
60

